

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 200426152

UDC \_\_\_\_\_

厦门大学

硕士学位论文

孤儿受体 TR3 抑制 p300 诱导的 RXR $\alpha$  乙酰化

Orphan receptor TR3 attenuates the p300-induced  
acetylation of retinoid X receptor  $\alpha$

赵文秀

指导教师姓名: 吴 乔 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2007 年 6 月 1 日

论文答辩时间: 2007 年 7 月 5 日

学位授予日期: 2007 年 月 日

答辩委员会主席: 陈奕欣

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2007 年 6 月

# 厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在            年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期：     年   月   日

导师签名：

日期：     年   月   日

# 目 录

中文摘要 .....	1
英文摘要 .....	2
前言.....	4
<b>1 视黄素受体 RXR .....</b>	<b>4</b>
1.1 视黄素受体的发现.....	4
1.2 视黄素受体的结构.....	4
1.3 视黄素受体介导的信号途径.....	5
1.4 视黄素受体翻译后修饰.....	7
<b>2 乙酰化修饰及其生物学功能.....</b>	<b>8</b>
2.1 调节转录活性.....	9
2.2 调节蛋白与 DNA 及蛋白与蛋白之间结合 .....	9
2.3 抗泛素化, 调节蛋白稳定性.....	10
2.4 调节蛋白核浆转运.....	10
2.5 视黄素受体乙酰化的可能性.....	11
<b>3 孤儿受体 TR3 .....</b>	<b>11</b>
3.1 TR3 的发现 .....	11
3.2 TR3 的结构 .....	12
3.3 TR3 与细胞增殖 .....	13
3.4 TR3 与细胞凋亡 .....	13
<b>4 辅激活因子 p300.....</b>	<b>15</b>
4.1 p300 的结构特征.....	15
4.2 p300/CBP 转录调节机制.....	16
4.3 p300 生物学功能.....	17
4.4 p300---肿瘤抑制子? .....	20

5 本文研究的目的、内容和意义.....	21
材 料 与 方 法 .....	22
1 材 料.....	22
2 实验方法.....	24
2.1 细胞培养.....	24
2.2 药物处理.....	24
2.3 细胞转染.....	24
2.4 蛋白提取与 Western blot.....	25
2.5 免疫共沉淀.....	26
2.6 体内乙酰化实验.....	27
2.7 免疫荧光染色和观察.....	27
2.8 RNAi 实验.....	27
2.9 细胞凋亡分析.....	28
2.10 BrdU 检测.....	28
2.11 荧光素酶活性测定.....	29
结果与分析 .....	31
1 p300 诱导 RXR 乙酰化.....	31
2 K145 是 p300 诱导 RXR $\alpha$ 乙酰化的关键位点 .....	34
3 RXR $\alpha$ 乙酰化加强其 DNA 结合和转录活性 .....	35
4 TR3 抑制 p300 诱导的 RXR $\alpha$ 乙酰化.....	39
5 TR3 与 p300 竞争结合 RXR $\alpha$ .....	42
6 9-cisRA 有助于 RXR $\alpha$ 转运而非内源 RXR $\alpha$ 乙酰化.....	44
7 p300 和 TR3 对 RXR $\alpha$ 乙酰化调节的生物学意义.....	49
讨论与结论 .....	52
参考文献 .....	57
致谢.....	67

## Table of Contents

<b>Abstract in Chinese.....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>2</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>4</b>
<b>1 Retinoid X receptors (RXRs).....</b>	<b>4</b>
1.1 The discovery of RXR .....	4
1.2 The structure of RXR.....	4
1.3 Retinoid signal pathway.....	5
1.4 Regulation of RXR by posttranslational modification.....	7
<b>2 Acetylation and its biological functions.....</b>	<b>8</b>
2.1 Regulation of transcriptional activity.....	9
2.2 Regulation of protein-DNA and protein-protein.....	9
2.4 Regulation of protein stability .....	10
2.4 Regulation of nucleocytoplasmic translocation of protein.....	10
2.5 The possibility of acetylation on RXR.....	11
<b>3 Orphan receptor TR3 .....</b>	<b>11</b>
3.1 The discovery of TR3 .....	11
3.2 The structure of TR3 .....	12
3.3 Transcriptional regulation of TR3 .....	13
3.4 Apoptosis induced by TR3.....	13
<b>4 Coactivator p300.....</b>	<b>15</b>
4.1 The structure of p300 .....	15
4.2 Mechanisms of transcriptional activation of p300.....	16
4.3 Biological functions of p300.....	17
4.4 p300 ---a tumor repressor?.....	20

<b>5 Purpose of this thesis.....</b>	<b>21</b>
<b>Materials and Methods.....</b>	<b>22</b>
<b>1 Materials.....</b>	<b>22</b>
<b>2 Methods .....</b>	<b>24</b>
2.1 Cell culture.....	24
2.2 Drug treatment .....	24
2.3 Tansient transfection.....	24
2.4 Protein preparation and Western blots.....	25
2.5 Co-immunoprecipitation.....	26
2.6 In vivo acetylation assay .....	27
2.7 Immunofluorescent staining and microscopic observation.....	27
2.8 RNAi Assay .....	27
2.9 Cell apoptosis analysis.....	28
2.10 BrdU assay .....	28
2.11 Luciferase assay .....	29
<b>Results .....</b>	<b>31</b>
<b>1 p300 induces RXR<math>\alpha</math> acetylation .....</b>	<b>31</b>
<b>2 K145 is the p300-induced acetylation site on RXR<math>\alpha</math>.....</b>	<b>34</b>
<b>3 Acetylation of RXR<math>\alpha</math> increases its transcriptional and DNA-binding activity</b> .....	<b>35</b>
<b>4 TR3 inhibits RXR<math>\alpha</math> acetylation.....</b>	<b>39</b>
<b>5 TR3 competes with p300 binding to RXR<math>\alpha</math> .....</b>	<b>42</b>
<b>6 9-cis retinoic acid facilitates translocation rather than acetylation of</b> <b>endogenous RXR<math>\alpha</math>.....</b>	<b>44</b>
<b>7 Regulation of RXR<math>\alpha</math> acetylation by p300 and TR3 has distinct cellular</b> <b>functions .....</b>	<b>49</b>
<b>Discussion and conclusion .....</b>	<b>52</b>

<b>Reference.....</b>	<b>57</b>
-----------------------	-----------

<b>Acknowledgements .....</b>	<b>67</b>
-------------------------------	-----------

厦门大学博硕士论文摘要库



## 摘 要

蛋白翻译后的修饰如磷酸化(phosphorylation)、泛素化(ubiquitination)、类泛素化(sumoylation)和乙酰化(acetylation)在各种生命活动过程中起到了重要的作用。近年来,随着非组蛋白乙酰化的发现,乙酰化修饰越来越成为关注的热点。乙酰化修饰可以调节组蛋白和非组蛋白的各种功能,如转录活性,蛋白与蛋白之间的相互作用,以及蛋白的亚细胞分布等。虽然已经发现许多转录因子包括核受体可以被乙酰化,但是视黄素 X 受体 (retinoid X receptors, RXRs) 能否发生乙酰化及乙酰化如何被调控等问题尚不清楚。

在本文研究中,我们发现了 RXR $\alpha$ 的赖氨酸第 145 位点可以被 p300 乙酰化,乙酰化的 RXR $\alpha$ 结合到 DNA 上,加强其转录激活活性;此外我们还发现了孤儿受体 TR3 是 p300 诱导 RXR $\alpha$ 乙酰化的负调节因子。首先,TR3 通过与 RXR $\alpha$ 结合抑制了 p300 诱导的 RXR $\alpha$ 乙酰化。其次,TR3 与 p300 竞争结合 RXR $\alpha$ ,在 RXR $\alpha$ 的特异性配体 9-cis RA 作用下,RXR $\alpha$ 与 TR3 结合增强,并以异源二聚体形式转运到线粒体;与此同时,RXR $\alpha$ 与 p300 的结合减弱,p300 诱导的 RXR $\alpha$ 乙酰化和转录活性被抑制。最后,细胞生物学功能分析表明,在 HeLa 细胞中,p300 通过乙酰化 RXR $\alpha$ 加强其促有丝分裂的活性;相反,TR3 抑制 p300 诱导的细胞增殖,并且在 9-cis RA 作用下,TR3 与 RXR $\alpha$ 一起转运到线粒体诱导细胞凋亡。

本文研究不仅探讨了 p300 和 TR3 调节 RXR $\alpha$ 乙酰化的不同机制,同时还揭示了孤儿受体在视黄素受体转录调控中的新作用。

**关键词:** 视黄素受体 $\alpha$ (RXR $\alpha$ ); 孤儿受体 TR3; p300 蛋白; 乙酰化

## Abstract

Acetylation regulates the functions of histone and nonhistone proteins, including transactivation activity, protein interaction, and subcellular localization. Although many transcription factors, including nuclear receptors, have been shown to be modified by acetylation, whether retinoid X receptors (RXRs) are acetylated and how their acetylation is regulated remains unknown. Here, we provided the first evidence of RXR $\alpha$  acetylation by p300 at lysine 145. Acetylation of RXR $\alpha$  facilitated its binding to DNA and increased its transcriptional activity. Importantly, we discovered that TR3, an orphan receptor, exerted a negative regulation on p300-induced RXR $\alpha$  acetylation. Firstly, TR3 significantly reduced the p300-induced RXR $\alpha$  acetylation, and such inhibition required the TR3-RXR $\alpha$  interaction. Secondary, TR3 competed with p300 binding to RXR $\alpha$ . Moreover, treatment of cells with RXR $\alpha$  ligand 9-cis retinoic acid enhanced the interaction of RXR $\alpha$  with TR3 more than that with p300. Under this circumstance, p300-induced RXR $\alpha$  acetylation and transcriptional activity was inhibited, whereas the TR3/RXR $\alpha$  translocation had been facilitated. Finally, biological function analysis revealed that p300 stimulated the mitogenic activity by RXR $\alpha$  in HeLa cells in an acetylation-dependent manner. In contrast, TR3 repressed the p300-induced cell proliferation, and itself was translocated with RXR $\alpha$  to mitochondria to induce apoptosis of HeLa cells in response to 9-cis retinoic acid. Together, our data demonstrate the distinct regulatory mechanisms of p300 and TR3 on RXR $\alpha$  acetylation, and reveal a previously unrecognized role for orphan receptor in the transcriptional control of retinoid receptors.

**Key words:** retinoid X receptor  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ); orphan receptor TR3; p300 protein;

acetylation

厦门大学博士论文摘要库

## 前 言

### 1 视黄素受体RXR

视黄素受体RXR属于类固醇/甲状腺激素受体超家族成员,介导着许多激素、维生素A和其它药物的生物学功能。RXR参与了众多机体的生理调控过程,从胚胎发育到器官形成,以及成体的各种新陈代谢过程。近年来还发现,RXR在不同配体调控下可以进行核浆穿梭,执行不同的生物学功能,如细胞凋亡,增殖和分化<sup>[1-4]</sup>。

#### 1.1 视黄素受体的发现

继视黄酸受体(retinoic acid receptors, RARs)发现后,1990年Mangelsdorf<sup>[5]</sup>等用人视黄酸受体 $\alpha$  (hRAR $\alpha$ )的DNA结合区域的cDNA筛选人的肝和肾细胞中的cDNA文库,发现了一种新的cDNA,经过序列分析,确定为一个编码462个氨基酸的cDNA,它的翻译产物能被视黄酸 (retinoic acid, RA)激活,并诱导转录。因为它的结构与RAR有很大的相似性,但对RA 的反应比RAR低,因此被命名为人视黄素X受体 $\alpha$  (human retinoid X receptor  $\alpha$  , hRXR $\alpha$ )。Mangelsdorf等人同时还发现了hRXR $\alpha$  相似的另一受体hRXR $\beta$ 。以后,人们陆续在不同动物、不同组织中发现了RXR $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 的存在<sup>[5-8]</sup>。

#### 1.2 视黄素受体的结构

同其它核受体一样,RXR分子结构也可分为A/B、C、D和E五个区(图2)<sup>[9,10]</sup>。A/B区是氨基端,不依赖于配体的细胞组织特异性的转录激活自调节区。C

区是DNA 结合区(DNA Binding Domain, DBD), 这个区域具有高度的保守性, 含有8个半胱氨酸组成的两个锌指, 还参与二聚体的形成。E 区较大, 被称为配体结合区(Ligand Binding Domain, LBD), 含有12个 $\alpha$ 螺旋和一个 $\beta$ 折叠, 形成了

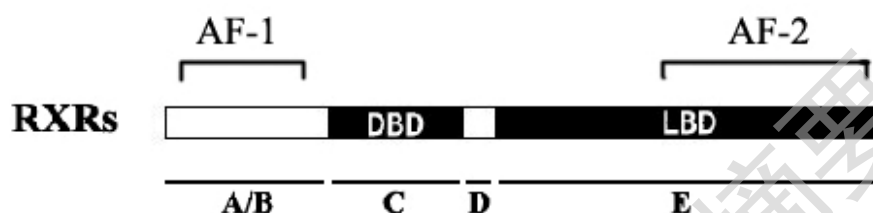


图1 RXRs 结构示意图

Fig.1 Structure of RXRs

一个三层的反平行的螺旋三明治结构(图 3)<sup>[11, 12]</sup>; E 区主要功能是参与配体的识别和二聚体的形成, 也具有调节 A/B 区的功能。D 区是疏水区, 连结着 DBD 和 LBD 区, 因此也被称为铰链区(Hinge Range), 保证 DBD 可以旋转, 构象发生改变而不发生原子排列的障碍; 同时, D 区还包含有入核序列, 影响受体核定位<sup>[13]</sup>。此外, RXR 分子上还有两个转录激活区, 即位于 A/B 区的 AF-1 和位于 LBD 的 AF-2。前者不需要配体的激活, 其自身就有微弱的自激活特性, 后者必须依赖配体的激活。

### 1.3 视黄素受体介导的信号途径

全反式视黄酸(all-*trans* retinoic acid, ATRA)和9-顺式视黄酸(9-*cis* retinoic acid, 9-*cis* RA)是不同受体选择性的视黄酸。在视黄酸配体存在下, RXRs和RARs形成异源二聚体RAR/RXR, 也可形成同源二聚体RXR/RXR。RARs自身不能形

成同源二聚体而结合到视黄酸应答元件(RA responsive element, RARE)上, 必须通过辅助蛋白RXRs的协助, 与RXRs形成异源二聚体后才能结合到RAREs上<sup>[14, 15]</sup>。一般来说, ATRA 结合到RAR/RXR异源二聚体上, 选择性地激活RARs; 而9-cis RA可以结合到RXR/RXR同源二聚体或者RAR/RXR异源二聚体上, 选择性地激活RXRs<sup>[16, 17]</sup>。激活后的RARs或RXRs与RAREs相互作用, 调控靶基因的转录和表达。

作为辅助性蛋白, RXR能和众多的核受体形成异源二聚体。除视黄酸受体RAR外<sup>[14, 15]</sup>, 还能与甲状腺激素受体(thyroid hormone receptor, TR)<sup>[18]</sup>, 维生素D受体(vitamin D receptor, VDR)<sup>[19]</sup>, 过氧化物增长因子激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)<sup>[20]</sup>, 以及孤儿受体如TR3<sup>[21]</sup>和COUP-TF<sup>[22]</sup>等形成异源二聚体, 由此介导视黄素和其他激素信号之间的相互作用, 调控不同的内分泌信号途径。

那么, 视黄素如何介导其受体调控下游靶基因转录的呢? 近年来, 视黄素受体的辅激活子(coactivators)和辅抑制子(corepressors)的发现揭示了视黄素受体介导并调控下游靶基因转录的机制。如图4所示, 在配体不存在时, RXR以异源二聚体RXR/RAR或同源二聚体RXR/RXR通过各自的DBD区与RARE结合, 同时还和辅抑制子如NCoR、SMRT结合。通过辅抑制子的结合增强了组蛋白去乙酰基酶的活性, 使得组蛋白去乙酰化, 由此抑制转录进程<sup>[23]</sup>。当配体与二聚体结合后, 由于二聚体蛋白中的LBD构象发生改变, 促使辅抑制子与二聚体解离, 此时辅激活子被募集并与二聚体结合, 激活了组蛋白的乙酰化、甲基化, 导致染色质去凝聚, 同时发生ATP 供能的染色质重组<sup>[24]</sup>。随后, 二聚体和辅激活子复合体解离, 进而与SMCC (Srb and Mediator protein containing complex)结合。SMCC可

以介导RNA聚合酶II和其它转录因子和异源二聚体结合，最终启动转录调控<sup>[25]</sup>。

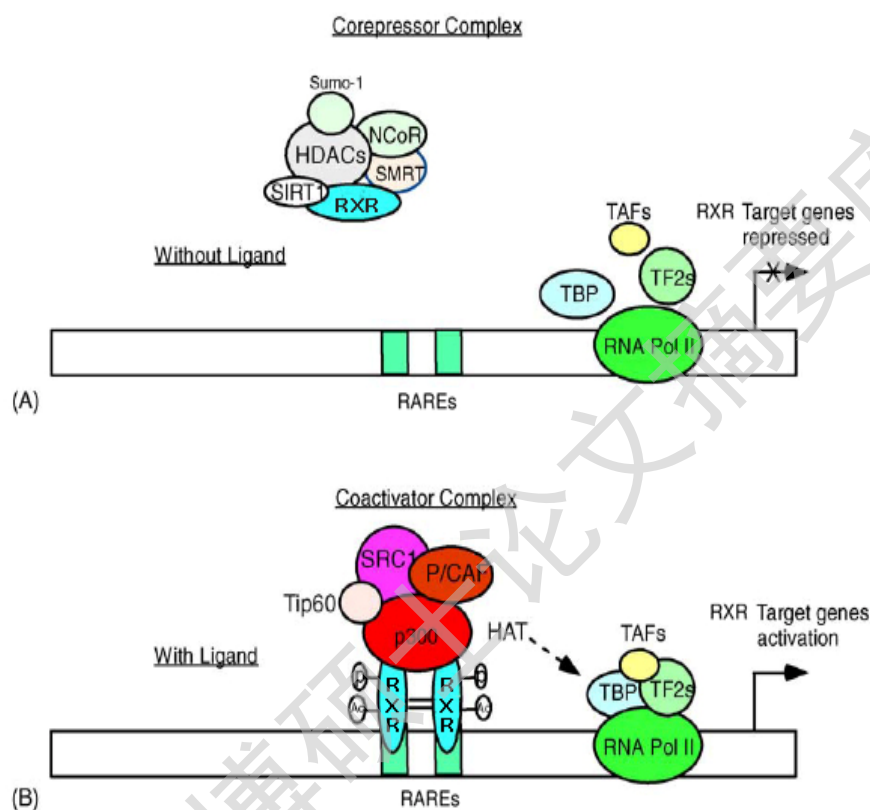


图2 视黄酸介导其受体调控下游靶基因转录模式图<sup>[26]</sup>(并做部分修改)

Fig. 2 Mechanism of retinoid receptor action

#### 1.4 视黄素受体翻译后修饰

视黄酸受体的转录活性不仅受到配体的调控，同时蛋白质的翻译后修饰如磷酸化、泛素化和类泛素化也都在调节视黄素受体的活性中起到重要的作用。

**磷酸化修饰：**研究表明，RXR可以被多种激酶磷酸化，如JNK1, JNK2, c-JUN, CDKs, p44MAPK<sup>[27]</sup>和MKK4<sup>[28]</sup>。RXR是激酶MKK4/SEK1的直接底物，MKK4/SEK1以不依赖于配体的方式磷酸化RXR的LBD区，其中酪氨酸的磷酸化

起到主要作用。MKK4磷酸化RXR后，配体诱导的RXR转录激活活性被抑制，而当酪氨酸249突变为苯丙氨酸后，磷酸化产生的抑制得以恢复。

泛素化修饰：Gary等人在研究紫外线对人角化细胞的影响时，发现紫外照射后，角化细胞中RXR $\alpha$ 的mRNA和蛋白水平明显下降，而且蛋白酶抑制剂MG132能够阻断这种降解，说明泛素和蛋白酶体参与了RXR $\alpha$ 蛋白降解的过程。同时，Gary等人还发现作为蛋白水解信号的特殊序列PEST，对于RXR $\alpha$ 的降解并没有发挥作用。在RXR $\alpha$ 蛋白存在两个PEST，一个位于AF-1区，一个位于铰链区，然而实验表明缺失其中一个或两个PEST的RXR $\alpha$ 突变体仍可发生泛素化<sup>[29]</sup>。

类泛素SUMO(small ubiquitin-related modifier)修饰：Chin Ha Chung等人发现RXR $\alpha$ 能与UBC9(类泛素转移酶E2)结合，且9-cis RA不影响这种结合。他们通过体外和体内类泛素化实验证明了RXR $\alpha$ 能在AF-1区域的赖氨酸108位点发生类泛素化。SUMO修饰影响RXR $\alpha$ 的活性，如RXR $\alpha$  SUMO化后不仅减弱了同源二聚体RXR $\alpha$ /RXR $\alpha$ 的转录活性，同时还减弱了RXR $\alpha$ 与其他核受体如PPAR，RAR等异源二聚体的转录活性。SUSP1(SUMO-specific protease)作为SUMO的特异蛋白酶可以逆转SUMO对RXR $\alpha$ 的修饰，去类泛素化的RXR $\alpha$ 则增强了其转录活性<sup>[30]</sup>。

我们课题组也发现，RAR $\alpha$ 在不同的肿瘤细胞中既发生泛素化也会发生类泛素化。在乳腺癌 MCF-7 细胞中，ATRA 通过泛素/蛋白酶体途径诱导 RAR $\alpha$ 降解，从而抑制了 RAR $\alpha$ /RXR $\alpha$ 异源二聚体与 DNA 结合。在这种情况下，RXR $\alpha$ 与RAR $\alpha$ 解离，并从细胞核转运到细胞浆。相反，在胃癌 BGC-823 细胞中，ATRA 诱导 RAR $\alpha$ 发生类泛素化，从而稳定 RAR $\alpha$  蛋白的表达并使 RAR $\alpha$ /RXR $\alpha$ 定位在细胞核，进而促使 RAR $\alpha$ /RXR $\alpha$ 异源二聚体成为介导 ATRA 信号途径的一个功能性亚单位<sup>[31]</sup>。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库